

**DE19860547**

**Publication Title:**

Affinity sensor for detecting specific molecular binding events and use thereof

**Abstract:**

Abstract not available for DE19860547

Abstract of corresponding document: US6878539

The invention relates to an affinity sensor for detecting specific molecular binding events, for use in the field of molecular biology, e.g., in medical diagnostics, especially in biosensor technology or in DNA microarray tests. The aim of the invention is to provide an affinity sensor of this type for rapidity, sensitivity, specifically, economically and routinely detecting the presence of molecules, especially bioactive molecules, and to provide special applications for an affinity sensor of this type. To this end, the affinity sensor consists of a support substrate which is provided with at least two electrodes. The electrodes are situated equidistantly from each other and cover an area on both sides, at least this area being provided for receiving immobilized specific binding partners which are capable of coupling complementary corresponding binding partners directly or with other specific binding molecules. The area is established with a minimum width  $b$ , in such a way that at least one complementary corresponding binding partner which is provided with an electroconductive particle can be received in the area in such a way as to guarantee the possibility of a tunnel-type contact junction forming between the particle and the electrodes in each case. The affinity sensor is used for biomonitoring.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

-----  
Courtesy of <http://v3.espacenet.com>



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Patentschrift  
10 DE 198 60 547 C 1

51 Int. Cl. 7:  
G 01 N 33/543  
C 12 Q 1/68  
C 12 Q 1/00  
G 01 N 27/327

21 Aktenzeichen: 198 60 547.1-52  
22 Anmeldetag: 23. 12. 1998  
43 Offenlegungstag: -  
45 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 12. 10. 2000

DE 198 60 547 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:

Genetrix B.V. i.o., Groningen, NL; Institut für  
Physikalische Hochtechnologie e.V., 07745 Jena,  
DE; Fritzsche, Wolfgang, Dr., 07743 Jena, DE

74 Vertreter:

Pfeiffer, R., Dipl.-Phys. Fachphys. f. Schutzrechtsw.,  
Pat.-Anw., 07745 Jena

72 Erfinder:

Czaki, Andrea, 07774 Camburg, DE; Fritzsche,  
Wolfgang, Dr., 07743 Jena, DE; Köhler, Johann  
Michael, Dr., 07751 Golmsdorf, DE; Oosting, Louis,  
Dipl.-Ing., Groningen, NL; Schut, Frederik, Dr.,  
Groningen, NL; Tan, Paris Som Tjwan, Dr., Haren,  
NL; Wiegand, Antje, Dipl.-Chem., 99099 Erfurt, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:

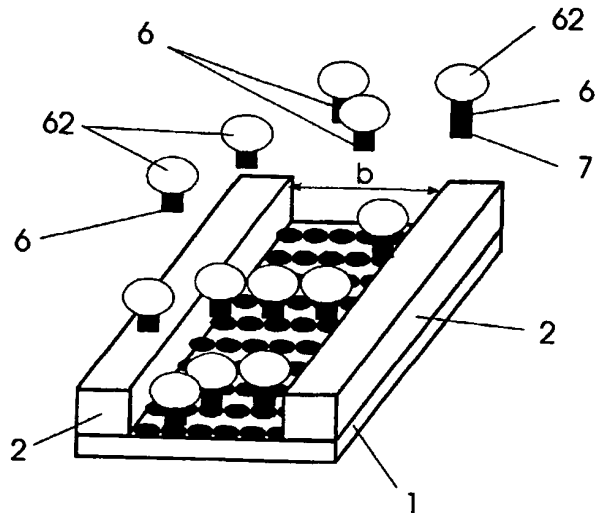
DE 196 10 115 A1  
US 57 80 234  
US 54 45 934  
US 50 77 210  
WO 98 29 740 A1

BEZRYADIN, A. (u.a.), in: Applied Physics  
Letters, 1997, Bd.71, S.1273-1275;  
BRAUN, E. (u.a.), in: Nature, 1998, Bd.391,  
S.775-778;  
ALIVISATOS, A.P. (u.a.), in: Nature, 1996,  
Bd.382, S.609-611;

54 Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse und dessen Verwendung

57 Die Erfindung betrifft einen Affinitätssensor für den  
Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse,  
wie er insbesondere auf dem molekularbiologischen Ge-  
biet, z. B. der medizinischen Diagnostik, speziell bei der  
Biosensor-Technologie oder im DNA-Microarray-Test, An-  
wendung findet.

Die Aufgabe der Erfindung, einen Affinitätssensor für den  
Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse  
zu schaffen, welcher in schneller, empfindlicher, spezifi-  
scher, aufwandgeringer und routinemäßiger Weise die  
Anwesenheit von Molekülen, insbesondere von bioakti-  
ven Molekülen, detektiert, sowie spezielle Verwendungs-  
möglichkeiten für einen derartigen Affinitätssensor anzu-  
geben, wird dadurch gelöst, daß ein Affinitätssensor aus  
einem Trägersubstrat (1) besteht, das mit wenigstens  
zwei zueinander in einem äquidistanten Abstand ange-  
ordneten Elektroden (2) versehen ist, die beidseitig einen  
Bereich (4) erfassen, wobei zumindest dieser Bereich (4)  
für die Aufnahme immobilisierter spezifischer Bindungs-  
partner (5) vorgesehen ist, die befähigt sind, komplementär  
zugehörige Bindungspartner (6) direkt oder über weite-  
re spezifische Bindemoleküle (7) zu koppeln und der Be-  
reich (4) mit einer Mindestbreite  $b$  so festgelegt ist, daß  
zumindest ein komplementär zugehöriger Bindungspart-  
ner (6), der mit einem elektrisch leitfähigen Partikel (62)  
versehen ist, im genannten Bereich derart aufnehmbar  
ist, daß zwischen dem Partikel (62) und den Elektroden (2)  
jeweils die Möglichkeit zur Ausbildung ...



DE 198 60 547 C 1

Die Erfindung betrifft einen Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse, wie er insbesondere auf dem molekularbiologischen Gebiet, bspw. der medizinischen Diagnostik, der Biosensor- oder DNA-Microarray-Technologie, eingesetzt wird, und dessen Verwendung.

Biosensoren sind Festphasenmeßapparaturen, die aus mindestens einem biologischen Rezeptor, einem Wandler und einer nachgeschalteten Elektronik bestehen.

Bei dem Rezeptor finden biologisch aktive Reagenzien, wie bspw. Antikörper, Anwendung, um eine bestimmte Substanz, wie bspw. Antigene, zu erkennen. Die Transduktion der Erkennungsereignisse in detektierbare Signale erfolgt durch den Wandler, bspw. mit elektrochemischen, optischen, piezoelektrischen oder kalorimetrischen Methoden. Dabei kann die Kopplung der Erkennungsereignisse an den Wandler auf indirektem oder direktem Wege erfolgen. Im ersten Fall modulieren die Erkennungsereignisse einen Prozeß, der von dem Wandler detektiert wird. Im zweiten Fall werden die Erkennungsereignisse selbst durch den Wandler aufgezeichnet. Der Wandler steht mit einer Elektronik in Verbindung, bspw. einem Mikroprozessor mit nachgeschalteten Modulen, zur Signalerfassung und Auswertung in Verbindung.

Die Anwendungsmöglichkeiten dieser, auf Grundlage der molekularen Erkennung arbeitenden Biosensoren ist vielfältig. Sie liegen u. a. auf dem Gebiet des Nachweises und der Konzentrationsbestimmung von Biomolekülen, der kinetischen und der Gleichgewichts-Analyse von biochemischen Reaktionen, der Überwachung von Fermentationsprozessen, der Charakterisierung von Rezeptor-Zell-Wechselwirkung, der klinischen Analyse und der Zell-Detektion.

Die Detektion der Anwesenheit bioaktiver Moleküle erfolgt im Fall der Nukleinsäuren bspw. durch Hybridisierung mit spezifischen und markierten Nukleinsäuresonden. Die Markierung der Sonden erfolgt durch den enzymatischen Einbau von Nukleotiden, die Radioisotope, wie bspw. Tritium, Schwefel-35 oder Phosphor-32, nichtradioaktive Moleküle, wie bspw. Digoxigenin oder Biotin bzw. nichtradioaktive, fluoreszierende Moleküle, wie bspw. Fluoresceinisothiocyanat oder 7-Amino-4-methylcumarin-3-acetat oder metallische Partikel, wie bspw. Gold, tragen (Nicholl, D., S., T., 1995: Genetische Methoden, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, S. 24-27).

Die Detektion der Anwesenheit bioaktiver Moleküle erfolgt im Fall von Antigenen, z. B. Peptiden oder Proteinen, mit spezifischen und markierten Antikörpern. Die Markierung der Antikörper erfolgt durch Ankoppeln von Radioisotopen, bspw. Iod-125 oder Tritium, an Tyrosin- bzw. Histidinreste, durch nichtradioaktive Enzyme, bspw. alkalische Phosphatase oder Peroxidase, wobei die enzymatische Aktivität, bspw. durch die Umsetzung eines farblosen in ein farbiges Produkt, gemessen wird, durch nichtradioaktive Enzyme, bspw. Hämatin, das die chemilumineszente Reaktion von Wasserstoffperoxid und Luminol bewirkt, durch nichtradioaktive Enzyme, bspw. Luciferase, die Biolumineszenz mittels phosphorilierter Luciferin bewirkt, oder durch metallische Partikel, bspw. Gold (Liddell, E. und Weeks, I.: 1996: Antikörpertechniken, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, S. 87-107).

Die Signale der verwendeten verschiedenen Markermoleküle werden durch radio- oder elektrochemische, optische, piezoelektrische oder kalorimetrische Verfahren zur Darstellung von molekularen Erkennungsereignissen ausgewertet. Die Größe der Einzelsignalaussendenden Markermoleküle liegt dabei im Nanometerbereich. Derzeit am meisten angewendet werden die optischen und die elektrochemi-

schen Verfahren zur Darstellung von molekularen Bindungsereignissen.

Das Problem der verschiedenen optischen Verfahren ist, daß die Sensitivität und die räumliche Auflösung der von den einzelnen Markermolekülen ausgesendeten Signale für viele Anwendungen zu gering ist, eine Bindung zwischen zwei Gliedern eines spezifischen molekularen Bindungspaares nicht nachgewiesen werden kann und daß oft ein unspezifischer Hintergrund die Signale überlagert. Diese Probleme der bildgebenden Verfahren können nur zum Teil durch eine experimentelle Verstärkung des Signals oder durch computergestützte statistische Bildanalyseverfahren bereinigt werden.

Eine technische Begrenzung der derzeitigen Automatisierung der Bildanalyse auf der Grundlage der Chip-Technologie liegt im Auslesen der verschiedenen Microarray-Spots. Die meisten verfügbaren Technologien beruhen auf der Detektion von fluoreszenzmarkierten Bindungspaares, die in einer spezifischen Art auf der Chip-Oberfläche festgehalten sind, wobei die Fluoreszenzdetektion durch optisches Auslesen der reaktiven Zentren des Microarrays ausgeführt wird. Der Gebrauch von fluoreszierenden oder chemilumineszierenden Proben findet dabei wie in den zuvor beschriebenen klassischen Methoden Anwendung und wird mit CCD-Imaging kombiniert (Eggers, M. et al., 1996: Professional Program Proceedings. Electro '96. IEEE, New York, NY, USA, 364pp.; Heller, M. J., 1996: IEEE-Engineering-in-Medicine-and-Biology-Magazine 15: 100-104), wobei auch hier die genannten Probleme der klassischen Bildanalyse auftreten und eine Bindung zwischen zwei Gliedern eines spezifischen molekularen Bindungspaares nicht nachgewiesen werden kann.

Die Detektion der Anwesenheit bioaktiver Moleküle kann neben den sehr häufig verwendeten optischen Verfahren auch auf elektrochemischem Wege durch verschiedene Verfahren erfolgen.

Bekannt ist die Möglichkeit der Messung von Redoxpotential-Änderungen bei Biomolekülen, die mit spezifischen Bindungsereignissen, bspw. an Enzymen, einhergehen. Dabei werden die Redoxpotential-Änderungen mittels einer mit Biomolekülen versehenen Einzelelektrode und einer Referenz-Elektrode gemessen (Heller, A., 1992: Electrical connection of enzyme redox centers to electrodes, J. Phys. Chem. 96: 3579-3587).

Der Nachteil dieser Methode ist, daß nur ein einzelnes elektronisches Ereignis für ein biomolekulares Bindungsereignis eintritt, wobei die Änderung des Redox-Zustandes, die bewirkt wird, nur kurzzeitig ist und somit die Detektion jedes individuellen Bindungsereignisses blitzartig erfolgen müßte; dies ist nicht möglich. Das erhaltene Signal ist lediglich kumulativ, so daß seltene Bindungsereignisse mit dieser Technologie nicht detektiert werden können.

Eine weitere Möglichkeit zur Detektion der Anwesenheit bioaktiver Moleküle auf dem elektrischen Weg stellen die Biosensoren in Form von speziellen Meßelektroden dar. Diese speziellen Meßelektroden bestehen im allgemeinen aus einer (Strept-)Avidin-beschichteten Elektrode, wobei das (Strept-)Avidin die Eigenschaft besitzt, Biotinmoleküle spezifisch zu binden. Dadurch ist es möglich, Peptide, Oligonukleotide, Oligo- und Polysaccharide sowie Lipide, die mit Biotin oder Biotinderivaten markiert sind, zu detektieren, bzw. diese an die (Strept-)Avidin-Schicht als Liganden zu koppeln, wobei in diesem Fall die Biotinmoleküle die Kopplungselemente darstellen. Im allgemeinen können mit diesen Biosensoren Antikörper/Antigen-, Antikörper/Hapten-, Saccharid/Lectin-, Protein/Nukleinsäure- und Nukleinsäure/Nukleinsäure-Bindungspaares detektiert werden. Die Detektion der an der speziellen Meßelektrode eintretenden

biochemischen Ereignisse erfolgt in ähnlicher Form wie bei der zuvor beschriebenen Technologie, die auf Redoxsystemen beruht, durch Messungen der Potential-Änderungen einer Einzelelektrode im Vergleich zu einer Referenz-Elektrode (Davis, et al., 1995: Elements of biosensor construction. *Enzyme Microb. Technol.* 17: 130-1035).

Nach DE 196 10 115 A1 kann eine Detektion von Molekülen oder Molekülkomplexen auch durch die Veränderung eines elektrischen Wechselfeldes in einer Ultra-Mikroelektrodenanordnung erfolgen. Dabei wird der Effekt benutzt, daß sich zwischen nahe benachbarten Elektroden elektrische Wechselfelder erzeugen lassen und der resultierende Strom hauptsächlich von den detektierten Molekülen und Molekülkomplexen im elektrodennahen Raum beeinflusst wird. Diese Beeinflussung kann durch Diffusion, durch Anlage- 10 rung oder Bindung erfolgen. Die Elektroden können dabei in Interdigitalanordnungen oder als durch eine isolierende Schicht getrenntes Kreuz angeordnet sein. Dabei sollte generell die Entfernung der Elektroden 3 µm, besser 1 µm, unterschreiten. Die nachzuweisenden Moleküle können sowohl zwischen als auch auf den Elektroden gebunden werden. Es werden Wechselströme mit Frequenzen zwischen 1 MHz und 10 MHz und Amplituden zwischen ca. 10 mV und 50 mV angelegt. Als Erweiterung dieser interdigitalen Anordnung können auf eine der Elektroden über die andere Elektrode ausspannende Elektrodenflächen positioniert sein, so daß eine vertikale Anordnung entsteht, welche für die Detektion benutzt wird, wie in WO 98/29740 A1 vorgeschlagen. Jedoch ist auch mit dieser Methode der Nachweis seltener Bindungsereignisse nicht möglich, da die Anwesenheit weniger Moleküle nur eine geringe Beeinflussung des Wechselfeldes bewirkt wird.

Ein wesentlicher Nachteil dieser konventionellen Biosensortechnologie ist dabei die geringe Sensibilität der über die Meßelektroden erzielten Messungen, der nicht dadurch be- 35 hoben werden kann, daß Liganden in unendlich großer Dichte auf die Meßelektrode, bspw. durch die Verwendung einer Dextranschicht, gebunden werden. Durch das zusätzliche Aufbringen, bspw. einer Dextranschicht, wird zwar durch die räumliche Ligandenanordnung eine Steigerung auf die bis zu sechsfache Ligandenkonzentration gegenüber der Ligandeneinfachschicht auf den Elektroden erreicht, ein Nachweis von seltenen Bindungsereignissen oder gar von einer Bindung zwischen zwei Gliedern eines spezifischen molekularen Bindungspaares ist jedoch nicht möglich.

Bekannt sind auch die Möglichkeit der Verankerung von spezifischen Antikörpern auf einem Halbleitertor eines Feldeffekttransistors, wobei durch die selektive Bindung von Antigenen an die spezielle Antikörperschicht eine Ver- 40 änderung in der Ladungsverteilung und damit in der Schaltung des Feldeffekttransistors erfolgt, die Möglichkeit der Immobilisierung von spezifischen Antikörpern auf der Oberfläche einer optischen Faser, wobei durch die selektive Bindung von Antigenen an die spezielle Antikörperschicht an der Schnittstelle von Faseroptik und Flüssigkeit meßbare optische Phänomene, wie bspw. interferierende Wellen und Oberflächenplasmonen, auftreten sowie die Methode der Oberflächenplasmonenresonanz, bei der bei einem definierten Einfallswinkel des Lichtes der Refraktionsindex eines Mediums an einem metallbeschichteten, mit spezifischen Antikörpern versehenen Glaskörper durch die selektive 60 Kopplung von Antigenen meßbar verändert wird (Liddell, E. und Weeks, I.: 1996: Antikörpertechniken, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, S. 156-158).

Der Nachteil dieser Methoden ist, daß seltene Bindungsereignisse mit diesen Technologien nicht detektiert werden können.

Obgleich der biochemische Prozeß der Bindungspaarbil-

dung bei Biosensoren, z. B. die Hybridisierung von zwei Nukleotidsträngen oder die Bindung von Antikörper an Antigen, selbst sehr schnell, d. h. im Sekundenbereich, verläuft, Biochips mit Bindemolekülen, z. B. spezifischen Oligonukleotiden (US 5,445,934) oder spezifischen Proteinen (US 5,077,210), bestückt werden können, so daß eine Chip-Technologie möglich ist (Osborne, J. C., 1994: Genosensors. Conference Record of WESCON/94. Idea/Microelectronics. IEEE, New York, NY, USA: 434pp.; Eggers, M. D. et al., 1993: Genosensors, microfabricated devices for automated DNA sequence analysis. Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. 1998), durch die innerhalb von Minuten die Gegenwart von bestimmten Biomolekülen, bspw. Genen durch spezifische Oligonukleotid-Sonden oder Antigene durch spezifische Antikörper detektiert werden kann und große Perspektiven auf dem Gebiet der Biologie oder Medizin, vor allem bei genetischen Untersuchungen, aufgezeigt werden (Chee, M. et al., 1996: Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science* 274: 610-614), gibt es zur Zeit nur wenige Methoden, mit denen Bindungen zwischen Molekülen bei niedrigen Konzentrationen oder gar bei einzelnen Molekülpaaren schnell festgestellt werden können (Lemieux, B., et al.; 1998: Overview of DNA chip technology. *Molecular Breeding* 4: 277-289).

Ein vielversprechender Ansatz für die Detektion von Bindungsereignissen zwischen Nukleinsäure-Bindungspaares besteht derzeit im Ausnutzen von dielektrischen Relaxationsfrequenzen der DNA zur Unterscheidung zwischen hybridisierten und nicht hybridisierten Proben (Beattie et al. 1993. *Clin. Chem.* 39: 719-722). Die Detektion dieser Frequenzunterschiede erfordert jedoch bisher sehr teure Aus- 30 rüstungen und ist darüber hinaus noch weit davon entfernt, routinemäßig angewendet zu werden.

Darüber hinaus ist ein weiterer Weg hybridisierte und nicht hybridisierte Proben elektronisch zu unterscheiden be- 35 kannt, der darin besteht, die Geschwindigkeit der Elektronenbewegung entlang der DNA-Stränge zu bestimmen (US 5,780,234). Diese Bestimmung basiert darauf, daß die Anordnung der Pi-Elektronenorbitale in doppelsträngiger DNA die Elektronen dazu veranlaßt, sich in doppelsträngiger, also hybridisierter DNA schneller zu bewegen als in einzelsträngiger DNA (Lipkin et al., 1995: Identifying DNA by the speed of electrons. *Science News* 147: 117pp.). Die Zielprobe muß dabei, um diese Elektronenbewegung zu be- 40 stimmen, exakt zwischen zwei Molekülen positioniert werden, von denen das eine chemisch so modifiziert ist, daß es als Elektronendonator dient, und das andere so, daß es als Elektronenakzeptor fungiert, so daß ein Elektronenfluß über Elektroden meßbar wird.

Diese aufwendige Methode besitzt den Nachteil, daß sie die Anwendung auf die Detektion von Einzelstrang-Nukleinsäurefragmenten von definierter Länge limitiert und für weitere Biomoleküle nicht geeignet ist.

Eine Methode zur elektrischen Detektion von Partikeln ist darüber hinaus durch Bezryadin, A., Dekker, C., und Schmid, G., 1997: Electrostatic trapping of single conducting nanoparticles between nanoelectrodes. *Applied Physics Letters* 71: 1273-1275, bekannt, wobei Nanopartikel in einen Elektrodenspalt gebunden werden, indem eine Span- 55 nung an die Elektroden angelegt wird und das Einfangen des Partikels anhand des fließenden Stromes detektiert wird. Im Gegensatz zu Bindungsereignissen von Biomolekülpaaren erfolgt dabei keine spezifische biochemische Bindung des Nanopartikels, sondern der Partikel wird durch das elektrische Feld an den Elektrodenspalt gebunden.

Aus einer Arbeit von Braun, E., Eichen, Y., Sivan, U. und Ben-Yoseph, G., 1998: DNA templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire. *Nature* 391:

775-778, ist weiterhin bekannt, daß DNA-Moleküle zwischen zwei mikrostrukturierte Elektroden spannbar sind und diese Moleküle erst nach ihrer Beschichtung mit Silber eine elektrische Leitfähigkeit zeigen, die jedoch in keinem Zusammenhang mit spezifischen biochemischen Bindungsereignissen von Biomolekülpaaren steht.

Durch Alivisatos, A., P., Johnsson, K., P., Peng, X., Wilson, T., E., Loweth, C., J., Bruchez Jr., M., P. und Schulz, P., G., 1996: Organization of nanocrystal molecules using DNA. *Nature* 382: 609-611, wurden Komplexe aus kurzen, einzelsträngigen DNA-Molekülen und ihren komplementären, einzelsträngigen, mit Goldpartikel markierten DNA-Molekülen in Lösung erzeugt und für die elektronenmikroskopische Charakterisierung auf ein TEM-Grid mit Kohlenstofffilm aufgebracht. Eine elektrische Charakterisierung der Molekülpaarbindung erfolgte dabei nicht.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse zu schaffen, welcher in schneller, empfindlicher, spezifischer, aufwandgeringer und routinemäßiger Weise die Anwesenheit von Molekülen, insbesondere von bioaktiven Molekülen detektiert, sowie spezielle Verwendungsmöglichkeiten für einen derartigen Affinitätssensor anzugeben.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch die Merkmale der Ansprüche gelöst. Insbesondere besteht ein Affinitätssensors aus einem Träger, welcher mit beabstandeten Elektroden versehen ist, die einen Bereich erfassen, der mit immobilisierten spezifischen Bindungspartnern versehen ist, welche komplementär zugehörige, elektrisch leitfähige Partikel tragende Bindungspartner spezifisch koppeln, so daß durch die Partikel ein elektrisch leitender Kontakt zwischen den Elektroden bildbar ist und dadurch die Bestimmung der Änderung des elektrischen Widerstandes bei an die Elektroden angelegter Spannung sowie Anwesenheit von einzelnen oder mehreren komplementär zugehörigen, elektrisch leitfähige Partikel tragenden Bindungspartnern detektierbar ist.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen und zugehörigen schematischen Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

**Fig. 1** einen Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse,

**Fig. 2** eine schematische Darstellung des Affinitätssensors für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse,

**Fig. 3** einen Querschnitt durch eine Ausführungsmöglichkeit des Affinitätssensors für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse,

**Fig. 4** eine Ausführung des Affinitätssensors in Form eines Affinitäts-Chips in der Draufsicht,

**Fig. 5** einen Schnitt durch den in Fig. 4 dargestellten Affinitäts-Chips entlang der Ebene A-A.

Der in den Fig. 1 und 2 dargestellte Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse besteht aus einem Trägersubstrat 1, das mit Elektroden 2 versehen ist, die einen Bereich 4 umgeben, der immobilisiert spezifische Bindungspartner 5 aufweist. Der Bereich 4 stellt dabei eine Diskontinuität in einem elektrischen Schaltkreis dar, welcher einen Verstärkerschaltkreis 8, der Teil eines Mikrochips 9 sein kann, sowie eine Meß- und Auswerteeinheit umfaßt, wobei die Elektroden 2, die den Bereich 4 begrenzen, im Beispiel dem elektrischen Schaltkreis zugeordnet sind und eine Mindestbreite  $b$  des Bereichs 4 bestimmen. Die spezifischen Bindungspartner 5 sind befähigt, komplementär zugehörige Bindungspartner 6 spezifisch direkt oder über weitere spezifische Bindemoleküle 7 zu koppeln, wobei die komplementär zugehörigen Bindungspartner 6 mit elektrisch leitfähigen Partikeln 62 direkt oder über

verbindende Moleküle gekoppelt sind. Der Bereich 4 ist durch die Anordnung der Elektroden 2 in seiner Breite und Wirkhöhe so bemessen, daß die Kopplung der immobilisierten spezifischen Bindungspartner 5 mit den komplementär zugehörigen, die leitfähigen Partikel 62 tragenden Bindungspartnern 6 oder den über weitere spezifische Bindemoleküle 7 mit den komplementär zugehörigen, die leitfähigen Partikel 62 tragenden Bindungspartnern 6 möglich ist. Für den Fall, daß die spezifischen Bindungspartner 5 durch Moleküle einer Nukleinsäuresondenspezies realisiert sind, die komplementär zugehörigen, die leitfähigen Partikel 62 tragenden Bindungspartner 6 Nukleinsäuren und die Partikel 62 Nanopartikel einer Größe von 20 nm sind, beträgt die Mindestbreite  $b$  des Bereichs 4 25 nm sowie seine Wirkhöhe 20 nm.

Die Kopplung der spezifischen Bindungspartner 5 in den Bereich 4 mit den komplementär zugehörigen, die leitfähigen Partikel 62 tragenden Bindungspartnern 6 bewirkt bei einer an die Elektroden 2 angelegten Spannung (vgl. Fig. 1) die Bewegung von Elektronen über die Elektronentransportbarriere in der Art, daß die elektrisch leitfähigen Partikel 62 den Bereich 4 überbrücken und die Elektronen von Partikel 62 zu Partikel 62 und zu den Elektroden 2 tunneln, so daß eine permanente Änderung des elektrischen Widerstandes über den Bereich 4 zwischen den Elektroden 2 mittels des nachgeschalteten Verstärkerschaltkreises 8 und der gekoppelten Meß- und Auswerteeinheit 3 meßbar ist.

Anstelle der Messung im Trockenen kann die Messung auch in feuchter Umgebung, insbesondere mit Hilfe einer Gelschicht vorgenommen werden.

Um die durch den komplementär zugehörigen Bindungspartner 6 mit gekoppelten elektrisch leitfähigen Partikeln 62 vermittelte elektrische Leitfähigkeit an dem Bereich 4 zwischen den Elektroden 2 zu verbessern, können bereits bekannte Elektronen-Transfer-Mediatoren oder effektive diffusive Elektronendonatoren und -akzeptoren wie wasserlösliche Ferrocen/Ferricinium, Hydrochinon/Chinon, reduzierbare und oxidierbare Komponenten von organischen Salzen, Cobaltocene, Hexa- und Octacyanide von Molybden, Wolfram und Eisen, bzw. Makrozyklen und Chelatliganden von Übergangsmetallen wie Kobalt, Ruthenium, und Nickel, einschließlich Co(ethylen-diamin)<sub>3</sub>- und Ru(ethylen-diamin)<sub>3</sub>- und Trisbipyridyl- und Hexaminkomplexe von Übergangsmetallen wie Co, Ru, Fe und bzw. organische Moleküle wie 4-4'-bipyridin und 4-mercaptopyridin verwendet werden, die frei in Lösung oder in einem, auf dem Trägersubstrat 1 aufgetragenen Gel oder in einem, auf dem Trägersubstrat 1 aufgetragenen Polymer vorliegen. Eine bekannte Matriximmobilisierung durch Gel besitzt im Fall der Anwendung von Nukleinsäuren als spezifische Bindungspartner 5 wegen des dreidimensionalen Aufbaus des Polymers den Vorteil, daß eine größere Anzahl Einfangliganden auf dem kleinen Oberflächenausschnitt des Bereichs 4 immobilisiert wird. Durch die Verwendung eines hochporösen Hydrogels wird bspw. die Hybridisierungsrate der Nukleinsäuren, die spezifische Bindungspartner 5 und komplementär zugehörige, die elektrisch leitfähigen Partikel 62 tragenden Bindungspartner 6 darstellen, erhöht und liegt in Bereichen wie sie für Nukleinsäuren in Lösung bekannt ist.

Der in den Fig. 3 und 4 dargestellte Affinitätssensor in Form eines Affinitäts-Chips ist dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden 2 als jeweils zwei paarweise angeordnete, eine Affinitätsfläche 41 erfassende Mikroelektroden 21 ausgebildet sind, so daß eine Matrix von Affinitätsflächen 41 vorliegt, die eine Vielzahl von verschiedenen Kopplungen an den verschiedenen Zwischenräumen 4 zeitgleich elektrisch detektiert.

Die einzelnen Affinitätsflächen 41 sind dabei in einer in-

terdigitalen Elektrodenstruktur auf einer aus bspw. mit einer dielektrischen Oxidschicht versehenen Silizium oder Glas bestehenden Chipfläche 42 ausgebildet. Durch die digital verzweigten, an ihren Schnittstellen 23 durch eine, wie in Fig. 5 dargestellt, zwischengelagerte Isolierschicht 24 voneinander räumlich und elektrisch getrennten Mikroelektroden 21, die bspw. in Form von Kammelektroden 22 gefertigt sein können, werden auf den Affinitätsflächen 41 die Bereiche 4 mit einer Länge im Bereich von 20 µm festgelegt, wobei für den Fall, daß die spezifischen Bindungspartner 5 durch Moleküle einer Nukleinsäuresondenspezies realisiert sind, die komplementär zugehörigen, die leitfähigen Partikel 62 tragenden Bindungspartner 6 Nukleinsäuren und die Partikel 62 Nanopartikel einer Größe von 20 nm sind, die Bereiche 4 eine Wirkhöhe von 100 nm und Breite von 200 nm besitzen, so daß mindestens eine, einen Kontakt zwischen den Elektroden 21 bewirkende Kopplung zwischen den immobilisierten spezifischen Bindungspartnern 5, die in diesem Beispiel Einfangliganden in Form von Nukleinsäuresonden darstellen, und den komplementär zugehörigen, die elektrisch leitfähigen Partikel 62 tragenden Bindungspartnern 6, die in diesem Beispiel Targetmoleküle in Form von Nukleinsäuren darstellen, erfolgt. Die als spezifische Bindungspartner 5 immobilisierten Oligonukleotidsonden werden dabei über eine Aminogruppe am silanisierten Trägersubstrat 1 gebunden, wobei die erzielte Sondendichte in diesem Beispiel in einer Größenordnung von 10000 Molekülen je µm<sup>2</sup> liegt. Die komplementär zugehörigen Bindungspartner 6 sind in dem gewählten Beispiel Oligonukleotide, die mit Goldpartikeln markiert sind und die Hybridisierungsbedingungen hängen jeweils von den verwendeten Sonden ab.

Alternativ dazu können die Affinitätsflächen 41 in jeweils voneinander getrennten Sektoren mit verschiedenen immobilisierten spezifischen Bindungspartnern 5 bestückt sein.

Auf dem in den Fig. 3 und 4 dargestellten Affinitäts-Chip sind Affinitätsflächen 41 mit immobilisierten spezifischen Bindungspartnern 5 und Referenzflächen 43 mit immobilisierten inaktiven Bindungspartnern 51 vorgesehen, so daß die Messung des elektrischen Widerstandes zwischen den Mikroelektroden 21, die als Kammelektroden 22 gefertigt sein können, im Vergleich des elektrischen Widerstandes einer Affinitätsfläche 41 zu einer Referenzfläche 43 erfolgt. Dabei können die immobilisierten spezifischen Bindungspartner 5 und die immobilisierten inaktiven Bindungspartner 51 auch die Elektroden 21 mit einer, einen Tunneleffekt zulassenden Dicke überdecken, wodurch eine technologisch einfachere Fertigung der Chips ermöglicht wird.

Da die Referenzfläche 43 durch die Besetzung mit inaktiven Bindungspartnern 51 frei von immobilisierten spezifischen Bindungspartnern 5 ist, stellt dieser Raum zwischen den zwei isolierten Mikroelektroden 21 eine elektrische Barriere dar, so daß ein meßbarer Elektronentransfer zwischen ihnen nicht stattfindet.

Die Affinitätsfläche 41, die hingegen immobilisierte spezifische Bindungspartner 5 trägt, bindet über diese durch das Kopplungsereignis die komplementär zugehörigen, elektrisch leitfähigen Partikel 62 tragenden Bindungspartner 6, so daß dadurch durch die leitfähigen Partikel 62 der Raum der Affinitätsfläche 41 zwischen den Mikroelektroden 21, die in Form der Kammelektroden 22 ausgebildet sind, in eine Vielzahl von nanometerbreiten Spalten geteilt wird. Die so durch die elektrisch leitfähigen Partikel 62 gebildeten Nanospalten führen dazu, daß ein Elektronentransfer zwischen den zwei Kontaktflächen der Mikroelektroden 21 durch Tunnelleffekte möglich ist, wodurch die Änderung des Widerstandes über die Verstärkereinheit 8 mittels einer Meß- und Auswerteeinheit 3 bei an die Mikroelektroden 21 angelegter Spannung ermöglicht wird. Die angelegte Spannung liegt

im Beispiel in der Größenordnung von unter einem Volt.

Alternativ zu der Messung des über der Affinitätsfläche 41 angelegten Potentials durch das Elektroden-systems aus Referenz-, Proben- und Gegenelektrode können auch andere Methoden der elektrischen Detektion, bspw. potentiometrische oder voltametrische Messungen angewendet werden.

Für die Immobilisierung der spezifischen Bindungspartner 5 bzw. die inaktiven Bindungspartner 51, wie z. B. Antikörper oder Nukleotidsonden, werden chemische Standardlinker genutzt, wie z. B. amino-modifizierte Liganden, so daß sie an die silanierte Chipfläche 42 gebunden sind und die Affinitätsflächen 41 bzw. die Referenzflächen 43 bilden.

Die Markierung der komplementär zugehörigen Bindungspartner 6, wie z. B. der Target-Proteine oder der Target-Nukleinsäure, mit elektrisch leitenden Partikeln 62 wird nach den bekannten Verfahren, so z. B. die Endmarkierung mit markierten Oligonukleotiden durch Verwendung von Ligasen durchgeführt.

Der Affinitätssensor, bspw. in Form des in den Fig. 3 und 4 dargestellten Affinitätschips, kann vielseitig Verwendung finden, so z. B. in der Molekularbiologie und medizinische Diagnostik, wo spezifische Bindungen von bioaktiven Molekülen an ihre korrespondierenden Bindungspartner, bspw. DNA, Proteinen, Sacchariden, zu bestimmen sind.

Mit dem Affinitätssensor ist es auf der Grundlage des elektrischen Nachweises spezifischer molekularer Bindungsereignisse in schneller, empfindlicher und spezifischer Weise möglich, ein Biomonitoring, z. B. von Molekülen, Viren, Bakterien und Zellen in verschiedensten Proben, bspw. in klinischen Proben, in Nahrungsmittel- und Umweltproben, wie z. B. aus Kläranlagen, durchzuführen.

Alle in der Beschreibung, den nachfolgenden Ansprüchen und der Zeichnung dargestellten Merkmale können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination miteinander erfindungswesentlich sein.

#### Bezugszeichenliste

- 1 – Trägersubstrat
- 2 – Elektroden
- 21 – Mikroelektroden
- 22 – Kammelektroden
- 23 – Schnittstellen
- 24 – Isolationsschicht
- 3 – Meß- und Auswerteeinheit
- 4 – Bereich
- 41 – Affinitätsfläche
- 42 – Chipfläche
- 43 – Referenzfläche
- 5 – spezifische Bindungspartner
- 51 – inaktive Bindungspartner
- 6 – komplementär zugehörige Bindungspartner
- 62 – elektrisch leitfähige Partikel
- 7 – spezifische Bindemoleküle
- 8 – Verstärkerschaltkreis
- 9 – Mikrochip
- A – Schnittebene
- b – Breite des Bereichs 4

#### Patentansprüche

1. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer Bindungsereignisse bestehend aus einem Trägersubstrat (1), das mit wenigstens zwei zueinander in einem äquidistanten Abstand angeordneten Elektroden (2) versehen ist, die beidseitig einen Bereich (4) erfassen, wobei zumindest dieser Bereich (4) für die Aufnahme immobilisierter spezifischer Bindungspartner (5) vorgesehen

ist, die befähigt sind, komplementär zugehörige Bindungspartner (6) direkt oder über weitere spezifische Bindemoleküle (7) zu koppeln und der Bereich (4) mit einer Mindestbreite  $b$  so festgelegt ist, daß zumindest ein komplementär zugehöriger Bindungspartner (6),  
 5 der mit einem elektrisch leitfähigem Partikel (62) versehen ist, in genannten Bereich derart aufnehmbar ist, daß zwischem dem Partikel (62) und den Elektroden (2) jeweils die Möglichkeit zur Ausbildung eines Tunnelkontaktübergangs gewährleistet ist.  
 10 2. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß dem Bereich (4) eine Breite  $b$  unterhalb von 800 nm gegeben ist.  
 3. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach Anspruch 1 dadurch  
 15 gekennzeichnet, daß die immobilisierten spezifischen Bindungspartner (5) auch die Elektroden (2) mit einer, einen Tunneleffekt zulassenden Dicke überdecken.  
 4. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach Anspruch 1 dadurch  
 20 gekennzeichnet, daß die Elektroden (2) als jeweils zwei paarweise angeordnete Mikroelektroden (21) ausgebildet und mit einem Verstärkerschaltkreis (8) verbunden sind, dem eine Meß- und Auswerteeinheit (3)  
 25 zugeordnet ist, so daß ein elektrischer Stromfluß über den Bereich (4) bei an den Elektroden (2) angelegter Spannung detektierbar ist.  
 5. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach den Ansprüchen 1  
 30 und 4 dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden (2) herausgeführter Bestandteil des Verstärkerschaltkreises (8) sind.  
 6. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach den Ansprüchen 1  
 35 und 5 dadurch gekennzeichnet, daß der Verstärkerschaltkreis (8) Bestandteil eines Mikrochips (9) ist.  
 7. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach Anspruch 1 dadurch  
 40 gekennzeichnet, daß die Elektroden (2) als kammartig ineinandergreifende Strukturen ausgebildet sind, wobei sich zumindest zwischen den jeweils gegenüberliegenden Kammelektroden (22) Affinitätsflächen (41) befinden.  
 8. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach den Ansprüchen 1  
 45 und 7 dadurch gekennzeichnet, daß die Kammelektroden (22) und die Affinitätsflächen (41) auf einer gemeinsamen Chipfläche (42) angeordnet sind.  
 9. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach den Ansprüchen 1  
 50 und 8 dadurch gekennzeichnet, daß die Chipfläche (42) durch ein Siliziumwafer gebildet ist.  
 10. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach den Ansprüchen  
 55 1 und 8 dadurch gekennzeichnet, daß die Chipfläche (42) durch ein Glastarget gebildet ist.  
 11. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach den Ansprüchen 1  
 60 und 7 dadurch gekennzeichnet, daß die Kammelektroden (22) geometrisch symmetrisch zu interdigitalen Strukturen und eine Vielzahl der Affinitätsflächen (41) zu einer Matrix angeordnet sind, wobei die außerhalb der Affinitätsflächen (41) verlaufenden Elektroden (2) an ihren Schnittstellen (23) voneinander durch eine dazwischen befindliche Isolationsschicht (24) getrennt  
 65 sind.  
 12. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer

molekularer Bindungsereignisse nach den Ansprüchen 1 oder 7 dadurch gekennzeichnet, daß die Länge der Mikroelektroden (21) 0,1 mm, die Breite  $b$  des Bereichs (4) 0,1  $\mu\text{m}$  und seine Wirkhöhe 0,02  $\mu\text{m}$  betragen sowie die Affinitätsfläche (41) zur Chipfläche (42) in einem Verhältnis von 1 : 10 steht.

13. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach den Ansprüchen 1 oder 7 dadurch gekennzeichnet, daß neben den Affinitätsflächen (41) wenigstens eine Referenzfläche (43) vorgesehen ist, die anstelle der spezifischen Bindungspartner (5) inaktive Bindungspartner (51) für Referenzmessungen tragen.

14. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach Anspruch 1 oder 7 dadurch gekennzeichnet, daß die einzelnen Affinitätsflächen (41) in unterschiedlicher Dichte mit den spezifischen Bindungspartnern (5) besetzt sind.

15. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach Anspruch 1 oder 7 dadurch gekennzeichnet, daß die einzelnen Affinitätsflächen (41) unterschiedliche spezifische Bindungspartner (5) tragen.

16. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach den Ansprüchen 1, 13, 14 oder 15 dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Referenzflächen (43) vorgesehen sind, die mit unterschiedlichen inaktiven Bindungspartnern (51) besetzt sind.

17. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach dem Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die spezifischen Bindungspartner (5) koordinative Verbindungen eingehen.

18. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach dem Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die spezifischen Bindungspartner (5) bioaktive oder biomimische Moleküle sind.

19. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach den Ansprüchen 1 und 17 dadurch gekennzeichnet, daß die spezifischen Bindungspartner (5) Nukleinsäuren sind.

20. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach den Ansprüchen 1, und 17 dadurch gekennzeichnet, daß die spezifischen Bindungspartner (5) Proteine sind.

21. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach den Ansprüchen 1, und 17 dadurch gekennzeichnet, daß die spezifischen Bindungspartner (5) Saccharide sind.

22. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die leitfähigen Partikel (62) in einer Größe von 0,1 bis 5  $\mu\text{m}$  festgelegt sind.

23. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die leitfähigen Partikel (62) in einer Größe im Nanometerbereich festgelegt sind.

24. Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach dem Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die leitfähigen Partikel (62) aus Metallclusterverbindungen bestehen.

25. Verwendung des Affinitätssensors für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach einem der vorstehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß der Affinitätssensor für die Detektion von komplementär zugehörigen Bindungspartnern (6) in Form von Komplexverbindungen eingesetzt wird.

26. Verwendung des Affinitätssensors für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach Anspruch 25 dadurch gekennzeichnet, daß der Affinitätssensor für die Detektion von komplementär zugehörigen Bindungspartnern (6) im Form von bioaktiven und biomimetischen Molekülen eingesetzt wird. 5
27. Verwendung des Affinitätssensors für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach Anspruch 25 dadurch gekennzeichnet, daß der Affinitätssensor für die Detektion von komplementär zugehörigen Bindungspartnern (6) im Form von Nukleinsäuren eingesetzt wird. 10
28. Verwendung des Affinitätssensors für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach Anspruch 25 dadurch gekennzeichnet, daß der Affinitätssensor für die Detektion von komplementär zugehörigen Bindungspartnern (6) im Form von Proteinen eingesetzt wird. 15
29. Verwendung des Affinitätssensors für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach Anspruch 25 dadurch gekennzeichnet, daß der Affinitätssensor für die Detektion von komplementär zugehörigen Bindungspartnern (6) im Form von Sacchariden eingesetzt wird. 20
30. Verwendung des Affinitätssensors für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach einem der vorstehenden Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß der Affinitätssensor zum Biomonitoring eingesetzt wird. 25
31. Verwendung des Affinitätssensors für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach Anspruch 30 dadurch gekennzeichnet, daß der Affinitätssensor zur Detektion von Zellen eingesetzt wird. 30
32. Verwendung des Affinitätssensors für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach Anspruch 30 dadurch gekennzeichnet, daß der Affinitätssensor zur Detektion von Mikroorganismen eingesetzt wird. 35
33. Verwendung des Affinitätssensors für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach Anspruch 30 dadurch gekennzeichnet, daß der Affinitätssensor zur Detektion von genetischen und mikrobiellen Erkrankungen eingesetzt wird. 40
34. Verwendung des Affinitätssensors für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach Anspruch 30 dadurch gekennzeichnet, daß der Affinitätssensor zur Detektion der Genexpression eingesetzt wird. 45
35. Verwendung des Affinitätssensors für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach Anspruch 32 dadurch gekennzeichnet, daß der Affinitätssensor zur Detektion von Mikroorganismen in ökologischen Populationen eingesetzt wird. 50
36. Verwendung des Affinitätssensors für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse nach Anspruch 30 dadurch gekennzeichnet, daß der Affinitätssensor zur medizinischen Diagnostik eingesetzt wird. 55

---

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

---

60

65



- Leerseite -

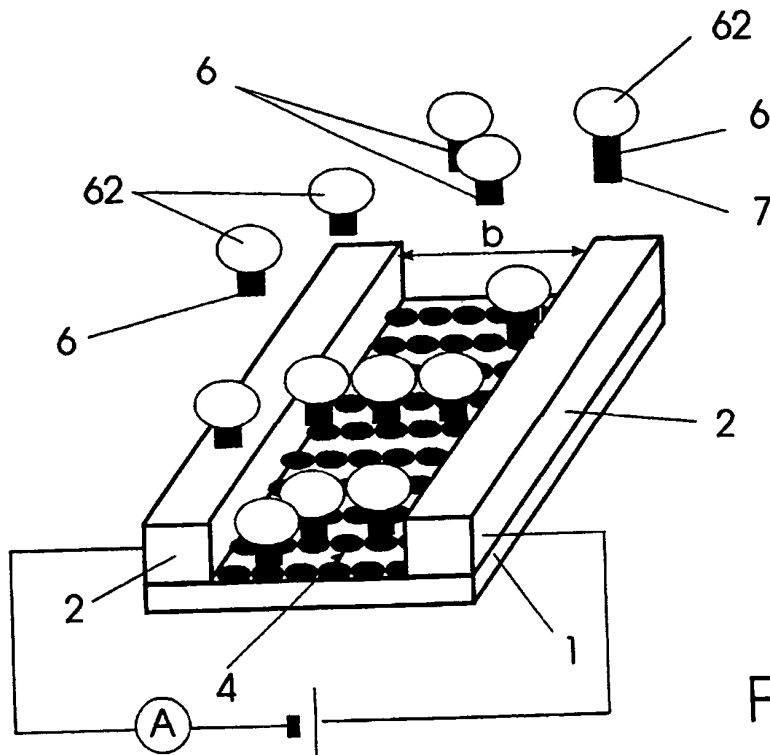


Fig. 1

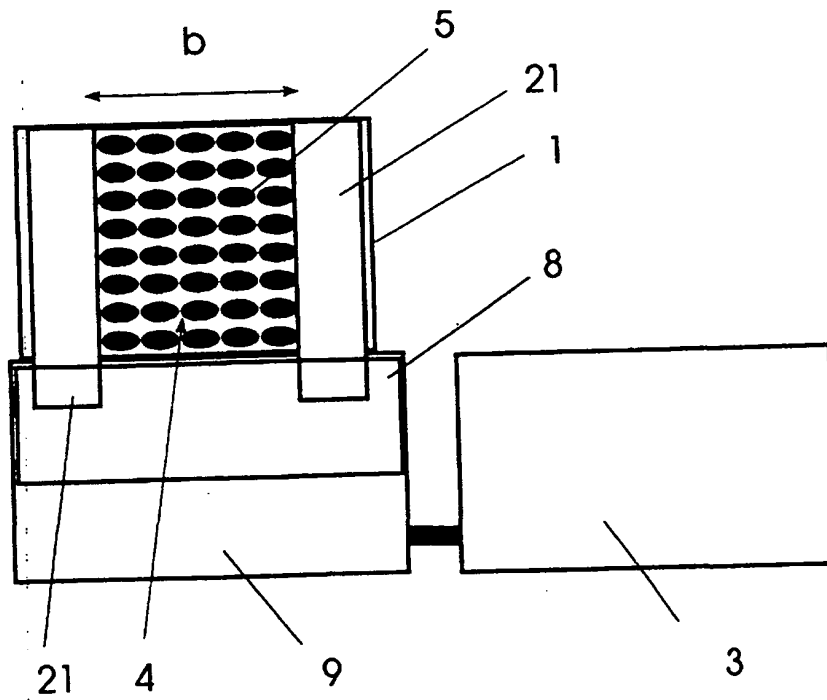


Fig. 2

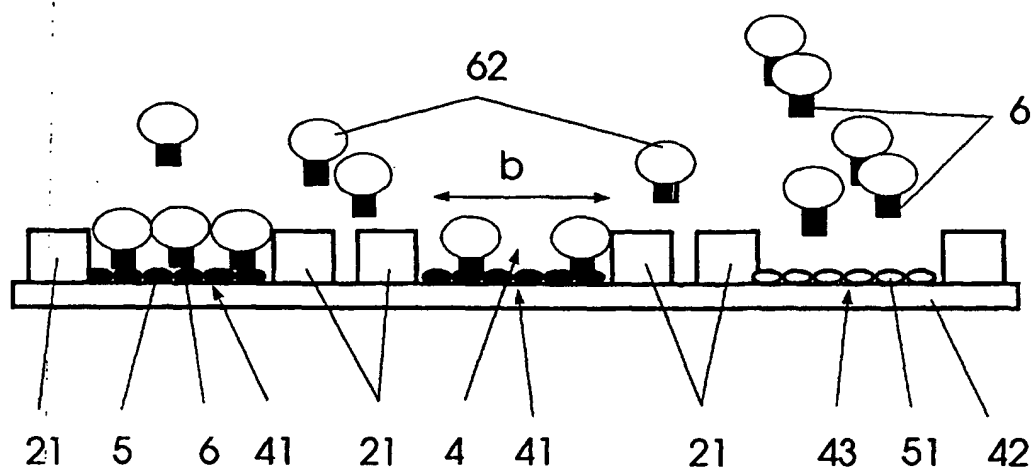


Fig. 3

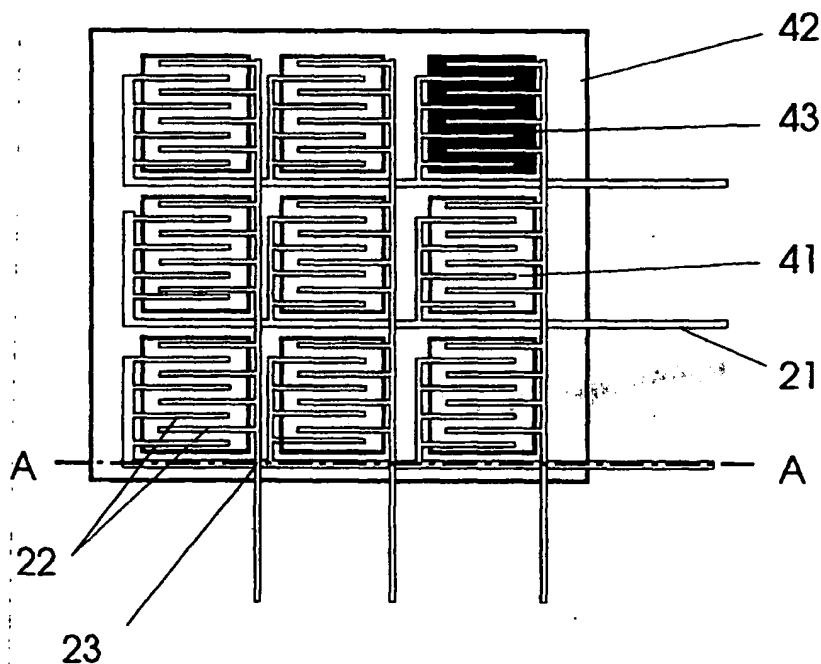


Fig. 4

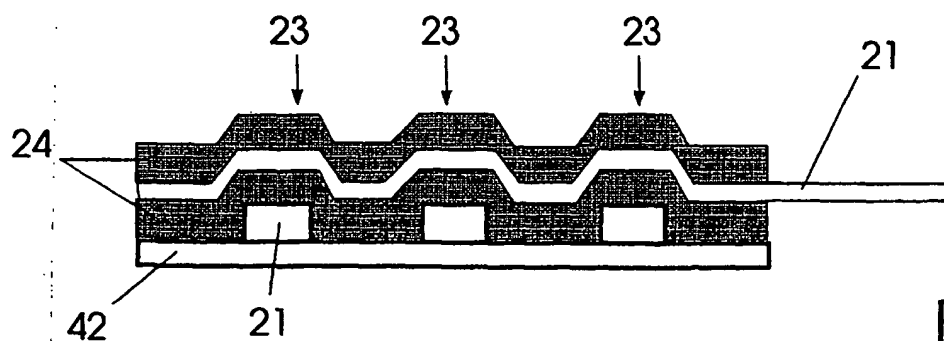


Fig. 5

THIS PAGE BLANK (uspto)